

Aus dem Württ. Tierärztlichen Landesuntersuchungsamt
in S t u t t g a r t

Vorstand: Oberreg.-Vet.-Rat Dr. O. S c h e u

Untersuchungen über das Vorkommen von
B a c i l l u s a n t h r a c i s
in einem Wolle und Haare verarbeitenden
Industriebetrieb.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktor-Grades
bei der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität
zu Giessen

eingereicht von
Albert R a u
Veterinärpraktikant aus Faurndau
Giessen 1957

STANFORD-LANE MEDICAL LIBRARY

Aus dem Württ. Tierärztlichen Landesuntersuchungsamt
in S t u t t g a r t

Vorstand: Oberreg.-Vet.-Rat Dr. O. S c h e u

Untersuchungen über das Vorkommen von
B a c i l l u s a n t h r a c i s
in einem Wolle und Haare verarbeitenden
Industriebetrieb.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktor-Grades
bei der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität
zu Giessen

eingereicht von
Albert R a u
Veterinärpraktikant aus Faurndau
Giessen 1957

Mit Genehmigung der Veterinär-Medizinischen Fakultät
Giessen

Dekan: Professor Dr. R. W e t z e l

Berichterstatter: Professor Dr. R o o t s

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 1957

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	5
Literaturbesprechung	7
Eigene Untersuchungen	29
Zusammenfassung	43
Schlußbetrachtung	44
Literaturverzeichnis	46
Lebenslauf	52

Einleitung:

In Europa waren die durch den *Bacillus anthracis* bedingten Milzbranderkrankungen bei unseren Haustieren früher in fast allen Staaten stark verbreitet. Entsprechend der unterschiedlichen Empfänglichkeit einzelner Tierarten für den Milzbrandbazillus, erkrankten insbesondere Schafe, Rinder, Pferde und Ziegen, selten Schweine und noch seltener Hunde. In neuerer Zeit verursacht nach Hutyra-Marek die Krankheit nur noch in manchen östlichen und südlichen Ländern der Erde empfindliche Verluste. Das Zurückgehen der Seuchenausbrüche ist der Schutzimpfung in gefährdeten Gebieten, der Besserung der hygienischen Verhältnisse im allgemeinen und der Trockenlegung der verseuchten Weideplätze zuzuschreiben. So ist nach Hutyra-Marek das Milzbrandvorkommen als Bodenkrankheit in wirtschaftlich fortgeschrittenen Gebieten gewöhnlich nur auf gewisse Gegenden, sogenannte Milzbranddistrikte, mit feuchtem, sumpfigem oder Überschwemmungen ausgesetztem Boden, beschränkt. In solchen Bezirken werden vornehmlich Weidetiere zur warmen Jahreszeit von der Krankheit befallen. In anderen Gegenden tritt sie nur sporadisch auf und wird meist durch Verfüttern sporenhaltiger Futtermittel im Stall und durch Aufnahme infizierten Wassers verursacht.

In den Jahren 1955 und 1956 ereigneten sich im Kreis Göppingen, einer Gegend, in der Milzbrand bis dahin kaum bekannt war, gehäufte Milzbranderkrankungen bei Rindern. Im Laufe dreier Monate zu Beginn des Jahres 1955 waren allein 7 Milzbrandfälle zu verzeichnen. In einigen wenigen Fällen war es möglich, eine mutmaßliche Infektionsquelle anzugeben. Zum Beispiel dürfte eine Erkrankung wahrscheinlich auf Haardung (aus Nordbaden) zurückzuführen sein, der das Futter mit *Bacillus anthracis* "verunreinigte". Ein anderer Fall verdankt wohl folgendem Umstand seine Entstehung: Der Stall, in dem die Tiere untergebracht sind, diente früher als Notschlachthaus. Als anlässlich einer Überschwemmung das Wasser infektiöses

Material aus Ritzen und Fugen des Bodens an die dort lagernden Rüben schwemmen konnte, wurden diese zu Keimträgern. Das Zustandekommen der meisten Erkrankungen blieb jedoch ungeklärt. Es wurde zwar bei mehreren Erkrankungsfällen das Wasser als Infektionsquelle verdächtigt, da die betroffenen Betriebe ihr Wasser von Quellen beziehen, in deren näherer Umgebung ein Wasenplatz früher seinem vermeintlich hygienischen Zwecke diente. Auch die feuchten, niederschlagsreichen Jahre 1955 und 1956 mit ihren oft starken Regengüssen konnten zu dem Verdacht führen, dass sich keimhaltiges Wasser vom Wasenplatz dem Quellwasser beimischen konnte. Die Erkrankungen standen jedoch in keiner zeitlichen Relation zu den Niederschlagsmaxima, und auch die Untersuchung von Wasserproben auf das Vorhandensein von Milzbrandkeimen verlief negativ. Da in einigen Betrieben mit Milzbrandfällen eine Düngung der landwirtschaftlich genutzten Flächen mit sogenanntem "Haardung" üblich war, fiel der Verdacht auf einen Betrieb der Haare und Wolle verarbeitenden Industrie. Es wurde mir nun die Aufgabe gestellt, Materialproben aus diesem Industriebetrieb auf das Vorkommen von Milzbrandbazillen zu untersuchen. Es geschah dies mit der freundlichen Erlaubnis des Betriebsinhabers, der selbst an diesen Untersuchungen interessiert war.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Oberreg.-Vet.-Rat Dr. S c h e u meinen verbindlichsten Dank für die Überlassung des Themas und das rege Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat, aussprechen.

I Das Vorkommen von Milzbrandkeimen.

Gelangen Milzbrandbazillen mit Blut, Exkreten, Kadavern und Kadaverteilen milzbrandkranker Tiere in die oberflächlichen Erdschichten, so entstehen aus ihnen bei günstiger Temperatur (32°C) rasch Sporen, während bei Temperaturen unter 16 bis 20°C die vorhandenen Saprophyten, die vegetativen Formen zerstören, ehe Sporen gebildet werden. (Minett 1950). Den versporteten Keimen kann nun eine lange Lebensdauer und die Erhaltung ihrer Virulenz beschieden sein. So fanden Gonzenbach in 2 Meter Tiefe eines aufgelassenen Aasplatzes nach 6 Jahren und Manninger in 1,5 Meter Tiefe nach 24 Jahren noch keimfähige Sporen.

Glenn Van Ness und C.D.Stein versuchten die Beziehungen zwischen Bodentypen und Bodenbeständigkeit des Milzbrandes klarzulegen. Beiden Forschern fiel auf, daß zahlreiche der auf den Boden zurückzuführenden Milzbrandinfektionen in den USA sich auf neutralen oder alkalischen Böden ereigneten. Eine Erklärung für diese Tatsache glaubten sie in der Mitteilung von Minett und Dhendra zu finden, wonach die Konservierung und Entwicklung von Milzbrandkeimen in neutralem oder leicht alkalischem Boden begünstigt wird. Da namentlich Kalziums Salze die Neutralität des Bodens bedingen, scheint Kalzium (alkalische Reaktion) indirekt zur Erhaltung der Infektionsquelle Boden beizutragen. Hierzu steht Renaux's Feststellung im Widerspruch, daß Kalzium auf die Entwicklung der Milzbrandkeime toxisch wirke, also die Vermehrung und Versporung hindere und die Virulenz vermindere. Manninger erklärt das Verschwinden der Milzbrandkeime von verseuchten Weiden zum Teil mit der antibiotischen Wirkung der vulgären Bodenflora. Ferner sollen nach Archipov Milzbrandsporen im Boden auch durch den Anbau gewisser Kulturpflanzen wie Weizen, Roggen, Futterwicke, Klee, Knoblauch und Zwiebeln vernichtet werden. Nach Hutyra-Marek bleibt die früher ganz allgemein vertretene Ansicht, wonach Milzbrandsporen im Sommer bei günstiger Gestaltung der Feuchtigkeits- und Temperaturverhältnisse im Boden wieder

auskeimen, die Bazillen sich vermehren und wieder Sporen erzeugen können, in Anbetracht der dieser Auffassung widersprechenden Versuchsergebnisse von Minett, einstweilen dahingestellt.

In verseuchten Gebieten kann auch das Trinkwasser gefährlich werden, vor allem dann, wenn beim Tränken der Schlamm, worin die Milzbrandsporen sich anzuheften pflegen, aufgewirbelt oder mitgeschöpft und aufgenommen wird. Diese Gefahr ist besonders in den niederschlagsarmen Sommermonaten groß, in denen der Wasserstand absinkt.

Der Ansteckungsstoff kann durch fließendes Oberflächenwasser sowie durch den Wind von infizierten Orten an nicht infizierte gebracht werden. In tieferen Schichten des Erdreichs liegende Milzbrandsporen können nach Pasteur durch Regenwürmer an die Oberfläche gebracht werden; diese Ansicht konnte jedoch Robert Koch nicht bestätigen! Das steigende Grundwasser dürfte kaum Keime an die Erdoberfläche bringen, wie dies Pettenkofer angenommen hat. Hingegen können Erdbewegungen im Bereich von Aas- und Abdekereiplätzen, wo vor Jahrzehnten Milzbrandkadaver vergraben wurden, für einen Teil der Milzbrandfälle verantwortlich gemacht werden. (Wanke, Sickert und Gaiger); dies hat auch Haupt festgestellt.

Bei der Verseuchung von Weideplätzen und der Infektionsverbreitung kann auch der Kot kranker - und in Milzbrandgebieten auch gesunder - Haustiere eine Rolle spielen, da er Milzbrandsporen enthalten kann. Auch der Kot von Vögeln, Füchsen, Hunden und Schakalen kann Sporen enthalten; nach Kraneveld und Mansjoer halten sich Milzbrandsporen bis zu 3 Wochen im Darm derartiger Tiere nach Aufnahme von Milzbrandkadaverteilen.

Von infizierten Böden können Milzbrandsporen auf Futterpflanzen gelangen, deren Verzehr zu Erkrankungen unserer Haustiere führt. Ausländische Fleisch- und Fischfuttermehle, bisweilen auch unzureichend erhitzte Tiermehle aus Milzbrandkadavern können die Infektion vermitteln. Mc. Fadyean hat 1903 darauf

hingewiesen, daß die Milzbrandfälle in England zumeist durch importierte Futtermittel verursacht werden; Stockman schätzt, daß 80 % der Fälle durch den Verzehr solcher Futtermittel verursacht sind. In Deutschland wurden 1914 7181 Milzbrandfälle festgestellt; diese Zahl fiel bis zum Jahre 1919 allmählich bis auf 743, weil ausländische Futtermittel während der Kriegszeit nicht eingeführt wurden. In ähnlicher Weise fiel während des 2. Weltkrieges in England die Zahl der Milzbrandfälle von 699 (1939) auf 95 (1946) und stieg wieder auf 407 (1951) an.

Nach Berichten von Rembold, Müssemeier und Beisswänger werden der Boden, das Futter und Trinkwasser zuweilen durch Weich- und Schmutzwasser, sowie Abfallstoffe von Gerbereien, Bürstenfabriken und Roßhaarspinnereien infiziert. Als fortdauernde Keimreservoirs können nach den Untersuchungen von Hailer und Heicken (1950) ausländische Schaf- und Ziegenfelle angesehen werden. Diese Felle werden aus der Türkei, Indien, Algerien, Südafrika und Jugoslawien eingeführt.

Heim, Laubenheimer und Eurich berichten über den gelungenen Nachweis von Milzbrandsporen an Ziegenhaaren und an Wolle ausländischer Herkunft. R. Koch äußerte schon 1876 die Ansicht, daß Milzbranderreger, die auf das Fell gesunder Schafe und Ziegen gelangen, sich dort saprophytisch stark vermehren können, ohne daß die Tiere an Milzbrand erkranken. Zu derselben Ansicht kommt Gegenbauer.

Wilson und Miles teilen die beim Menschen vorkommenden Milzbrandfälle in 2 Gruppen, eine Gruppe, die außerhalb industrieller Produktionsstätten beschäftigte Leute wie Schäfer, Bauern, Metzger, Tierärzte usw. betrifft, und eine andere Gruppe, die bei Industriearbeitern vorkommt. In England und Wales erkrankten in der Zeit von 1932-1951 492 Menschen und in den USA von 1919-1949 2447 Menschen an Milzbrand, wovon bei letzteren zwei Drittel sich in Industriebetrieben infiziert haben. (Wolf, Heimann). In England werden die Milzbrandfälle industriellen Ursprungs in 5 Gruppen eingeteilt.

Das Vorkommen industriellen Milzbrandes in Großbritannien

	Wolle	Pferde- haare	Häute u.Felle	Andere Rohmat.	Hafen- arbei- ter	Zusammen
1918	49	4	14	1	3	71
1919	34	3	16	4	3	60
1920	25	5	17	1	4	52
1921	11	4	8	2	0	25
1922	19	9	16	1	1	46
1923	14	9	22	1	4	50
1924	19	4	16	4	2	45

Der Mensch infiziert sich ~~also~~ im allgemeinen nur, wenn er mit Tieren oder tierischen Produkten in Kontakt kommt. Die Infektiosität der Milzbrandbazillen für den Menschen ist gering und es ist eine allgemeine Erfahrungstatsache, dass bei Auftreten eines menschlichen Milzbrandfalles zahlreiche Milzbrandkeime in seiner Umgebung überall gefunden werden können.

II Die Bakteriologie des Milzbranderreger in der Literatur

A Geschichtliches und Systematik.

Schon im Altertum war der Milzbrand als eine zeitweilig verheerende und auf Menschen übertragbare Tierseuche bekannt. Seine Ansteckungsfähigkeit wurde zuerst von Eilert im Jahre 1836 durch erfolgreiche Übertragung von Milzbrandblut festgestellt. Im Blute verendeter und kranker Tiere wurde der Erreger erstmals von Pollender 1849 und ein Jahr darauf von Davaine und Rayer nachgewiesen. Als diagnostisch verwertbare Gebilde wurden sie bereits 1857 von Brauell erachtet. Nachdem Delafond 1860 sie als Bakterien erklärt hatte, stellte Davaine 1863 ihre ätiologische Bedeutung endgültig fest. In der Systematik werden die Erreger des Milzbrandes in der Ordnung der Eubacteriales unter der Familie der Bacillaceae als Bacilli

aufgeführt.

B Diagnose der Milzbranderreger.

Zum Nachweis der Milzbrandkeime stehen uns 6 Möglichkeiten zur Verfügung:

1. der mikroskopische Nachweis,
2. die Kultur,
3. der Tierversuch,
4. die serologische Methode,
5. der Perlschnurtest und
6. der Phagentest.

Die grampositiven Milzbrandbazillen sind plumpe, am Ende quer abgeschnittene und plump erscheinende Zylinder (1,0-1,5 zu 5-6 μ), die zu mehreren in Reihen angeordnet und von einer gemeinsamen Kapsel umgeben sind. Die Enden erscheinen oft bambusähnlich geschwollen. Die Kapsel ist im Blut und Plasma der an Milzbrand gestorbenen Wiederkäuer stets deutlich nachweisbar, tritt aber bei Pferden, Carnivoren und Vögeln nur unsicher auf, weshalb z.B. die Feststellung von Milzbrand der Einhufer des Gutachtens eines Staatl. Vet.-Unt.-Amtes bedarf, bei Anthraxverdacht von Wiederkäuern aber durch den beamteten Tierarzt getroffen werden kann.

Auf künstlichen Nährböden gewachsene Milzbrandbazillen besitzen zumeist keine Kapsel. (Sonderheiten siehe bei Sterne).

Der Kapselnachweis erfolgt durch das Färbeverfahren nach Olt, Johne oder Foth. Standfuß und Pohl bevorzugen die Foth'sche Färbung.

Kapselfärbung nach Foth:

Auf unfixierte lufttrockene Ausstriche
2 Tropfen unverdünnte Giemsalösung
bringen; nach 1-2 Minuten 1 ccm destilliertes Wasser zugeben. Schwenken, mischen und weitere 2-5 Minuten einwirken lassen; kurz und kräftig abspülen. Die lufttrockenen Präparate mit Ölimmer-

sion betrachten. Die Kapsel ist rosafarben, der Bazillenleib blau.

Sind die Bazillen bereits der Autolyse anheim gefallen - dies spielt zuweilen bei älteren Kadavern eine Rolle - dann sind oft noch leere Kapseln - auch Milzbrandschatten genannt - sichtbar.

Bei Zutritt atmosphärischen Sauerstoffes, ausreichender Feuchtigkeit, Zeit und Wärme, d.h. in künstlicher Kultur und unter obigen Voraussetzungen im natürlichen Material bilden Milzbrandbazillen Sporen. Die Sporen sind von ovaler Form und haben einen Durchmesser, der kleiner als der des Bacillus ist. Sie treiben somit den Bazillenleib nicht auf.

Asporogene Stämme können spontan oder nach Züchtung bei höheren Temperaturen (Pasteur) auftreten.

Kolle und Hetsch empfehlen besonders das Klein'sche Sporenfärbeverfahren. Andere Färbeverfahren zur guten Sichtbarmachung von Sporen sind die Verfahren nach Rakette und Wirtz.

Der kulturelle Nachweis der Anthrax-Bazillen erfordert mehr Zeit als die mikroskopische Methode und ist an ein Laboratorium gebunden. Die Milzbrandbazillen gedeihen auf allen gebräuchlichen Nährmedien.

Auf der mit Bazillen oder Sporen beimpften und aerob bei 37° C bebrüteten Agarplatte zeigen sich nach 24 Stunden Kolonien von granulierter Oberfläche und unscharfer Randpartie, kometenschweifartigen Ausläufern und medusenhauptähnlicher Anordnung der Fäden.

Sterne (1937), der die Anwesenheit von Kohlendioxyd in künstlichen Kulturen als den natürlichen Umweltbedingungen entsprechend ansieht, gibt an, daß in 10-20 % Kohlendioxyd enthaltender Atmosphäre sich virulente Bazillen in Form runder, glänzender Kolonien von schleimiger Beschaffenheit, die in der Hauptsache aus bekapselten Keimen bestehen, vermehren. Diese Kolonieform kann als die sogenannte Glatt- oder S-Form aufgefaßt werden und ist ebenso Ausdruck der Virulenz wie bei anderen Bakterienarten (z.B. Rotlauf, Brucellen, u.a.). Werden virulente

Milzbrandbazillen in der üblichen Atmosphäre gezüchtet, also einer nicht optimalen Atmosphäre, so vermehren sie sich unbekapselt in trockenen Kolonien, die aus langen, zopfartig verflochtenen Bazillenketten bestehen und wegen ihrer lockenartiger Ausläufer mit einem Medusenhaupt vergleichbar sind. Diese Form ist als Rau- oder R-Form anzusprechen, aber im Gegensatz zu der Wuchsform der avirulenten Milzbrandbazillen nur als eine vorübergehende Erscheinung zu werten, da die Keime derartiger Kolonien in kohlendioxydhaltiger Atmosphäre wieder Kolonien der S-Form bilden. Auf Blut-Agarplatten lassen die Milzbrandkolonien einen hämolytischen Hof vermissen. Im Bereiche der Kolonien wird jedoch nach Buza der Nährboden von der 14.-16. Stunde an heller und von der 24. Stunde an ganz durchsichtig und nimmt hier eine grünlichgelbe Färbung an. Wagner macht darauf aufmerksam, daß die Blutplatten nach 16 bis 24stündiger Bebrütung zu besichtigen sind. Diese Erscheinung wird als hämopeptische Wirkung der Milzbrandbazillen angesprochen und ist nur den virulenten Bazillen eigen, einerlei ob die Züchtung bei Anwesenheit von Kohlendioxyd oder in gewöhnlicher Luft erfolgt. In ihrer Virulenz geschwächte oder gar avirulente Bazillen entfalten keine hämopeptische Wirkung.

Die Beweglichkeitsprüfung ist als eine wertvolle Methode für die Milzbranddiagnostik anzusehen. Die Unbeweglichkeit der klassischen unter natürlichen Bedingungen isolierten Milzbrandbazillen ist eine wichtige Stütze der Diagnose (Seidel). Die Spezifität der Beweglichkeitsprüfung hängt zum grossen Teil von der angewandten Methode bzw. dem dabei verwendeten Nährboden ab. Der "Hängende Tropfen" ergibt die schlechtesten Resultate und sollte deshalb nur zu Übersichtsuntersuchungen dienen.

Weidenmüller hält bei der Verwendung von 0,5 %igem Nähragar den Transmigrationsnährboden von Nordberg für entbehrlich. Er benutzte eine Objektträgermethode mit folgender Technik:

Mit Hilfe eines Agglutinationsröhrchens ausgestanzte und beimpfte Nährbodenplättchen werden in einer feuchten Kammer

bebrütet. Nach 6-8 Stunden ist der Nährboden bei beweglicher Verdachtskultur von einem feinen, trüben Überzug geschwärmter Bazillen bedeckt. Bei Unbeweglichkeit der Keime ist zwar die Kultur gewachsen, der unbewachsene Nährbodenteil jedoch oberflächlich glänzend geblieben.

Gelatine wird von Milzbrandbazillen verflüssigt. In der Bouillon bildet sich ein flockiger, schleimiger Bodensatz bei klarer darüberstehender Flüssigkeit. Es kommt zuweilen auch eine Trübung der Bouillon durch Milzbrandbazillen vor. Bei Züchtung von *Bacillus anthracis* in Pferdeserum hat Nordberg 4-6 Stunden nach der Beimpfung gutes Wachstum bei fehlender Kapselbildung beobachtet.

Der Tierversuch hat gegenüber den angeführten Untersuchungsmethoden den Nachteil, daß er mehr Zeit beansprucht. Dies betrifft sowohl die Ausführung des Versuches als auch die Zeitdauer des Versuchsablaufes. Die als Versuchstiere in Frage kommenden Tiere, wie Kaninchen, Meerschweinchen und Mäuse gehen nach der parenteralen Einverleibung auch geringer Mengen von vollvirulentem Milzbrandmaterial gewöhnlich in 1-3 Tagen an Milzbrandseptikämie zugrunde. Weidenmüller empfiehlt, Mäuse subkutan, Meerschweinchen intrakutan zu impfen. Weniger leicht gelingt ihre Ansteckung auf dem Fütterungswege, dagegen erweisen sich nach Neufeld Mäuse und Meerschweinchen für die Ansteckung durch die unversehrte Nasenschleimhaut als ziemlich empfänglich. Koch, Gaffky und Loeffler (1884) schlagen bei altem, verunreinigtem Untersuchungsmaterial vor, dieses auf der rasierten Bauchhaut von Meerschweinchen zu verreiben. Beim Tierversuch kann sich der Tod des Tieres im Zeitraum von 1-20 Tagen einstellen. Da Bazillen erst ab 3. Tag post injectionem im Herzblut zu finden waren, betont Standfuß die Notwendigkeit der Untersuchung der Impfstelle, wenn die Mäuse frühzeitig sterben. Man hat aber auch mit mäuseapothogenen Milzbrandstämmen zu rechnen.

Die Tatsache der nahezu unbegrenzten Haltbarkeit des Milzbrandantigens kommt der serologischen Methode, der

Präzipitationsmethode nach Ascoli, sehr zutreffend. Beim Milzbrandbazillus kommen 2 Antigene vor, die mit dem im Milzbrandserum befindlichen Präzipitin eine Fällung geben. Das eine ist in der Kapselsubstanz enthalten und stellt ein Glutaminsäurepeptid dar, das andere, ein Bestandteil des Protoplasmas, ist ein Polysaccharidmolekularverband und enthält in der Hauptsache in äquimolekularem Mengenverhältnis d-Glykosamin und Galaktose (Tomcsik und Szongott). Ivanovics konnte feststellen, dass die Kapselsubstanz der Milzbrandbazillen, die in gereinigtem Zustand zuerst von Tomcsik und Szongott isoliert wurde, als gruppenspezifisches Hapten der aeroben sporenhaltigen Bazillen zu betrachten ist. Dagegen darf das Polysaccharidantigen als für den Milzbranderreger spezifisch betrachtet werden. Interessant an der Ascoli-Probe ist, dass auch vorgeschrittene Fäulnis den positiven Ausfall der Reaktion nicht behindert. Ist die diagnostische Wirkungsbreite der Ascoli-Reaktion nun unbegrenzt oder sind ihre Grenzen bestimmter Art gesetzt? Zu dieser Frage einige Auszüge aus der Literatur über Milzbrand:

Von Zieger werden 4 Milzbrandfälle beim Schwein geschildert, die bei der Zerlegung nicht als solche diagnostiziert, sondern erst durch die bakteriologische Untersuchung erkannt wurden. In allen Fällen lag kein örtlich begrenzter Milzbrand vor. Die Ascoli-Reaktion war bei jedem Fall negativ. Kauker fand bei 126 serologisch untersuchten Anthrax-Fällen beim Rind viermal ein negatives Ergebnis, beim Schwein allerdings von 16 Fällen 6 negative. Auch die mit veränderten Teilen von an örtlichem Milzbrand erkrankten Schweinen ausgeführten Proben sind oft negativ. Wie Lütje berichtet, ist die Ascoli-Probe beim Milzbrand des Pferdes oft negativ. Weidenmüller betont, dass die Ascoli-Reaktion bei perakutem und örtlichem Verlauf negativ sein kann. Zur Untersuchung von eingeführten Rinderhäuten wurde von Standfuß und Schnauder ein Ascoli-Verfahren zur Massenuntersuchung ausgearbeitet und mehrere Jahre praktisch in Gerbereibetrieben erprobt. Nach Hailer und Heicken gewährleistet eine positive Ascoli-Reaktion noch nicht ein reichliches Vorkommen von Milzbrandbazillen an derselben Haut.

In Übereinstimmung mit der Feststellung anderer Autoren wurden bei der Untersuchung von 200 ascolipositiven Rinderhäuten nur 38,5 % Häute gefunden, an denen kulturell Milzbrandbazillen nachzuweisen waren. Bürger und Nehring machen darauf aufmerksam, dass ein geglückter Antigennachweis noch nicht ein reichliches Vorkommen von Milzbrandsporen bedeutet.

Acht ascolipositive Häute ergaben nur 2 kulturell positive. Es lassen sich aber auch bei bakteriologischer Prüfung nicht sehr selten stark infizierte Felle auffinden, die keine positive Ascoli-Reaktion ergeben. (Hailer-Heicken 1950). Auch Eidherr und Reichel fanden bei bakteriologischer Untersuchung von 105 Fellen 26 milzbrandinfizierte Felle, während von 200 Fellen aus derselben Versuchsreihe nur eines ascolipositiv war. Technik zur Ausführung der Präzipitationsprobe nach Ascoli:

Das zu untersuchende Blut oder zerkleinerte Organmaterial wird mit der 5-10fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgekocht und nach dem Abkühlen klar filtriert. In engen Röhrchen werden 0,5 ccm eines spezifischen präzipitierenden Milzbrandserums mit einem Kubikzentimeter Kochextrakt überschichtet. Eine schnell auftretende ringförmige Trübung zeigt den positiven Ausfall an. (Kontrollen des Kochextraktes mit Normalserum und des spezifischen Serums mit Extrakt aus Normalorganen müssen negativ ausfallen, solche des spezifischen Serums mit bekanntem positivem Extrakt positiv).

Zur Untersuchung von Häuten verwendeten Francke und Mitarbeiter mit 0,5 %iger Karbolkochsalzlösung im Kühlraum hergestellte Auszüge, sogenannte Kaltauszüge.

Wie erklären sich die angeführten Versager bei der serologischen Methode und wie kommen die Unterschiede im Ergebnis zwischen serologischem und bakteriologischem Verfahren zustande?

Zur Beantwortung dieser Fragen können Januschke's Un-

tersuchungsergebnisse herangezogen werden:

Acht Milliarden Einzelbazillen in einem Kubikzentimeter Bouillonkultur ergaben nach halbstündiger Kochextraktion lediglich in einer Verdünnung von 1:1 eine positive Ascoli-Reaktion. Daraus folgert Januschke, dass die Präzipitationsstärke nicht der Zahl der vorhandenen Milzbrandbazillen parallel gehen könne.

Versuche mit an Milzbrand verendeten Kaninchen und Mäusen, deren Organe in gewissen Zeitabständen bis zu 14 Tagen nach Eintritt des Todes kulturell, mikroskopisch und serologisch geprüft wurden, zeigten, dass die Leistungsfähigkeit der Ascoli-Reaktion nicht von der Zahl der vorhandenen geformten Bazillen abhängt, sondern von der Zahl der nicht mehr vorhandenen zerfallenen Bazillen. Reaktionsstärke und nachweisbare Keimzahlen sind umgekehrt proportional. Januschke schliesst seine Untersuchungen über die Ascoli-Reaktion mit folgenden Feststellungen:

1. Die Thermoextraktion (Erhitzen der verwendeten Organstücke) befördert rein physikalisch durch die hohe Temperatur und die mechanische Perturbation des Kochprozesses die Diffusion des in der Materie vorhandenen, aus den zerfallenen Milzbrandbazillen stammenden, absolut thermostabilen Präzipitinogens in die Extraktionsflüssigkeit.
2. Aufschliessung und Auslaugung geformter Milzbrandbazillen, gleichgültig ob versport, bekapselt oder kapsellos, findet nicht statt. Nur das Präzipitinogen früher zerfallener Bazillen ist nachweisbar.
3. Mit fortschreitendem Zerfall der Bazillen im Organmaterial steigt die Präzipitationsstärke auf das mehrfache, erreicht mit dem völligen Verschwinden der Bazillen ihren Gipfel und sinkt dann aus ungeklärten Gründen wieder herab.
4. In flüssigem Nährboden ist mit zunehmender Autolyse der Bakterien der gleiche Anstieg, aber kein Abfall der Kurve nachzuweisen.

5. Reaktionsgrenze, unterhalb welcher eine Reaktion ausbleibt, stellt der Präzipitinogengehalt von etwa 12-18 Millionen zerfallener Einzelbazillen im Kubikzentimeter Untersuchungsmaterial dar.

Auch Standfuß stellte fest, dass es sich bei der Untersuchung, wobei das Kaltauszugverfahren Anwendung findet, tatsächlich nur um den Nachweis des Präzipitins zerfallener Bazillen handelt.

Die angeführten Versager bei Allgemeininfektion und örtlicher Erkrankung der Schweine, bei Septikämie vieler Pferde und einiger Rinder können demnach folgendermassen erklärt werden: Das Organmaterial wies nicht den erforderlichen Präzipitinogengehalt auf, weil während der Erkrankung und kurz nach dem Tode die Bazillenzahl zu gering war oder von der grossen Zahl vorhandener Bazillen vielleicht aus irgendeinem noch nicht geklärten Grunde zum Zeitpunkt der Vornahme der Präzipitationsprobe noch nicht genügend viele zerfallen waren. Bei ascolinegativen aber mit vielen Sporen infizierten Häuten kann es sich um solche gehandelt haben, die mit Streusporen "verunreinigt" waren, deren Präzipitinogen durch die bekannten Extraktionsverfahren nicht in Freiheit gesetzt werden konnte. Die Häute können auch von Tieren stammen, deren Organismus zum Zeitpunkt des in Deutschland verbotenen Abhäutens wenig zerfallene Bazillen beherbergte, und die vielen intakten Keime die günstigsten Voraussetzungen zur Versporung hatten. Bei ascolipositiven, aber von kulturell nachweisbaren Erregern freien Häuten, handelte es sich wohl um Häute, in denen es zu keiner oder nur spärlichen Versporung kam, weshalb nur mehr die reagierenden Substanzen der Bazillen, nicht aber die Sporen nachzuweisen waren.

Seit einiger Zeit steht zur Laboratoriumsdiagnose des Milzbranderreger eine neue von Jensen und Kleemeyer ausgearbeitete Methode zur Verfügung - der Perlschnurtest. Mit ihm ist eine schnelle und zuverlässige Diagnosestellung möglich. Der Test beruht darauf, dass lebende Anthraxbazillen auf penicillinhaltigen Nährböden charakteristische abartige Formen,

sogenannte Involutionsformen, annehmen, die von der jeweiligen Penicillinkonzentration abhängig sind. Eine Konzentration von 0,5-0,05 I.E. Penicillin pro Kubikzentimeter Nährboden erwies sich als am besten geeignet. Die Milzbrandbazillen nehmen auf solchen Nährböden kugelige, die Fäden daher perlschnurartige Gestalt an. Bei höheren Konzentrationen werden die Kugeln zu klein, bei niedrigeren entstehen Ellipsoide und Walzenformen. Unter all den geprüften Antibiotika bewirkt nur Penicillin diese Formveränderung.

Die von Jensen und Kleemeyer angegebene und von Weidenmüller (1954) abgeänderte Technik wird folgendermassen ausgeführt:

Von der Kultur auf festem Nährboden (Agar, Blutagar) wird ein Bouillonröhrchen reichlich beimpft und dieses 3 Stunden bei 37° C bebrütet. Ist auf Grund mikroskopischer Untersuchung das vorliegende Organstück reich an milzbrandverdächtigen Keimen, so kann man das Gewebestück unmittelbar in Bouillon bebrüten und auf diese Weise Zeit gewinnen. Die 3-stündige Bouillonkultur, welche in der Regel ein deutliches Wachstum erkennen läßt, wird gut geschüttelt und hiervon je eine Öse auf die vorbereiteten Nährböden gebracht. Zur Herstellung der Penicillinnährböden setzt man die abgemessene Menge Penicillinlösung einem auf 45-50° C abgekühlten Fleischwasseragar so zu, dass man Nährböden mit 0,5 I.E. pro Kubikzentimeter und solche mit 0,05 I.E. erhält. Es darf der fertige Nährboden durch Hinzufügen der Penicillinlösung nicht zu weich werden und nach Erstarren nicht stärker als 2 Millimeter sein. Für den eigentlichen Test bringt man auf einen zuvor abgeflamten Objektträger je ein mit einem Agglutinationsröhrchen ausgestanztes Plättchen der beiden penicillinhaltigen Nährböden und dazu eines von gewöhnlichem Agar. Nach Beimpfung werden die 3 Agarplättchen 3 Stunden in der feuchten Kammer bei 37° C bebrütet, und dann die Agaroberfläche mit stärkerem Trockenobjektiv betrachtet. Beim Vorliegen von Anthrax zeigen sich auf den gewöhnlichen Agarplättchen lange gewundene,

zu Fäden ausgewachsene Bazillenketten. Auf den penicillinhaltigen Plättchen gleichen die mehr oder weniger langen Milzbrandketten aneinander gereihten Perlen, und zwar bei 0,05 I.E. pro Kubikzentimeter meist vollkommener als bei der höheren Konzentration. Nach zu langer Bebrütung oder zu spät erfolgter Ablesung können sich die penicillinhaltigen Nährböden frei von Keimen zeigen.

Als letztes und neuestes Glied in der Reihe der diagnostischen Verfahren soll noch der Phagentest eingeführt werden.

Durch Mc. Cloy und besonders Brown und Cherry wurden die Bakteriophagen in die Milzbranddiagnostik eingeführt.

Im Jahre 1951 isolierte Mc. Cloy von einem atypischen Cereusstamm einen Bakteriophagen, der alle untersuchten Milzbrandstämme angriff. Dieser Phage war bei allen Kulturen des Cereusstammes W anzutreffen. Er vermag Milzbrandbazillen anzugreifen und kann auf ihnen vermehrt werden, wenn sie in der R.-Form, also ohne Kapselbildung vorliegen. Brown und Cherry entdeckten bei dem Originalstamm W zufällig einen Phagenmutanten, den sie Gammaphagen nannten. Im Gegensatz zu allen bisher bekannten Phagen - die erwähnten anderen zeigen geringere Spezifität - wurden alle Milzbrandvarianten von dem Gammaphagen angegriffen. Kielwein verwendete bei seinen Untersuchungen den Phagen W und vermehrte ihn auf verschiedenen Bazillenstämmen, wobei sich zeigte, dass die Aktivität der aus den verschiedenen Milzbrandstämmen gewonnenen Phagen unterschiedlich war. Der Phage, dem die grösste Aktivität gegen Milzbrandstämme eigen war, wurde von ihm für seine Untersuchungen herangezogen. Die von Kielwein nach Prüfung verschiedener Verfahren zur Ausführung des Phagentestes als am geeignetesten erachtete Methode wird folgendermassen ausgeführt:

Von der verdächtigen Kolonie oder auch von dem die Bazillen in Reinkultur enthaltenden Organ werden auf der einen Hälfte einer Blutagar-, notfalls auch einer gewöhnlichen Agarplatte,

2 etwa markstückgroße Flächen mit kreisförmig ausgeführten Impfstrichen beimpft. Auf der anderen Hälfte der Platte werden 2 weitere Flächen in analoger Weise mit einem bekannten Milzbrandstamm beimpft. Nach 1 1/2 stündiger Bebrütung bei 37° C wird auf die Mitte je einer beimpften Nährbodenfläche der beiden Bazillenstämme mit einer Pasteurpipette ein Tropfen unverdünnter Phagenflüssigkeit gebracht. Um ein Eintrocknen dieser Flüssigkeit zu erzielen, werden die Platten 1/2 Stunde lang geöffnet in den Brutschrank gestellt. Bei Verwendung von Blutplatten kann nach weiterer 4-stündiger Bebrütung bei Vorliegen von Milzbrand eine ebenso deutliche Hemmung bis Unterdrückung des Wachstums wie bei der zu Kontrollzwecken angelegten Milzbrandkolonie beobachtet werden. Werden gewöhnliche Nähragarplatten verwendet, dann steht das Ergebnis erst einige Stunden später fest.

C Differenzierung des *Bacillus anthracis* von milzbrandähnlichen Keimen.

Die vielen milzbrandähnlichen Saprophyten zwingen zur genauesten Prüfung der verdächtigen Keime. Als die wichtigsten seien genannt: *B a c . s u b t i l i s* (Heubazillus), der auch die Synonyme *Bac. mesentericus fuscus* Flügge, *Bac. mesentericus vulgatus* Flügge, *Bac. lactis* und *Bac. cremoris* in der Literatur trägt *B a c . m e s e n t e r i c u s* (Kartoffelbazillus) mit den Synonymen *Bac. pumilus*, *Bac. mesentericus var. flavus*; *B a c i l l u s m e g a t h e r i u m*; *B a c i l l u s c e r e u s* mit den Synonymen *Bac. lacteus*, *Bac. anthracoides* Hueppe u. Wood, *Bakterium anthracoides* Trevisan und *Bac. pseudanthracis* Wahrlich. *B a c i l l u s m y c o i d e s* (Wurzelbazillus) auch als *Bacillus cereus var. mycoides* (Flügge) bezeichnet.

Nach Schmidt, Gordon und Clark kommen zwischen *Bac.*

megatherium und *Bac. cereus* Intermediusformen vor. Dieselben Autoren fassen *Bacillus anthracis* als eine pathogene Varietät von *Bac. cereus* auf. (Bergey)

Im folgenden seien kurz die Eigenschaften der Anthraxkeime angeführt, die mit denjenigen milzbrand-ähnlicher Keime zum Teil übereinstimmen und zu Verwechslungen Anlaß geben können. Zusammenstellung siehe Tabelle 1, Seite 26.

Brown, Moody und Cherry stellen fest, daß zwischen *Bac. anthracis*, *Bac. cereus* und *Bac. mycoides* mikroskopisch kein Unterschied von differentialdiagnostischer Bedeutung zu finden war. Die von Seidel an einem größeren Material vorgenommenen elektronenoptischen Vergleichsuntersuchungen hatten dasselbe Ergebnis. Ihrer großen Ähnlichkeit und ihres großen Formenreichtums wegen, sind morphologische Unterschiede zur Differenzierung der aeroben Sporenbildner kaum verwertbar.

Die Kapselbildungsfähigkeit ist außer virulentem Milzbrandbazillus, wenn er in zusagender Atmosphäre gezüchtet wird, auch dem in der S-Form vorliegenden *Bac. subt. eigen*. Den in ihrer Virulenz geschwächten, in CO_2 -freier Atmosphäre gezüchteten oder aus Material vom Pferde gewonnenen Milzbrandkeimen, kann ebenso wie den anthracoiden Bazillen die Fähigkeit zur Kapselbildung fehlen.

Bacillus anthracis ist unbeweglich, was beim *Bac. cereus*, wenn er in der R-Form vorliegt auch der Fall sein kann (Bergey). Mit Hilfe von Phagenlysaten hat Brown bewegliche Milzbrandmutanten erzeugt, die hochvirulent waren. Weidenmüller (1952) fand in "Hängenden Tropfen" von 97 *Bac. cereus*-Stämmen 8 träge beweglich oder unbeweglich, während all diese Stämme auf den Nährböden zur Beweglichkeitsprüfung beweglich waren.

Bezüglich des Wachstums auf gewöhnlichen Agarnährböden stellte Winkle fest, daß Milzbrandbazillen auf Agar in gewöhnlicher Atmosphäre matte trockene Kolonien bilden, die zum Rande hin abgeflacht sind und lockige Ausläufer, welche aus kettenförmig aneinander gelagerten Stäbchen bestehen, aufweisen. In ähnlicher Weise zeigen sich Kulturen von *Bac. subtilis* auf Agar, während die Aus-

läufer von *Bac. mycoides* mehr wurzel- oder pilzartig sind.

In Bouillon zeigen *Bac. anthracis* und *Bac. mycoides* ungefähr gleiches Verhalten, nämlich Bildung eines watteartigen, flockigen Bodensatzes bei klarer darüberstehender Flüssigkeit. Es ist aber auch damit zu rechnen, daß *Bac. anthracis* Trübung der Bouillon hervorrufen kann und dann von *Bac. cereus* in Bouillon schwer, besser noch von *Bac. subtilis* und *mesentericus*, die Trübung und meist ein Oberflächenhäutchen hervorbringen, zu unterscheiden ist. Das Wachstum auf Blutagar erfolgt bei *Bac. anthracis* wie bei *Bac. mesentericus* und *Bac. subtilis* ohne Bildung eines hämolytischen Hofes.

Bacillus anthracis und alle mit ihm verwandten Bazillen vermögen Gelatine zu verflüssigen, Milzbrandstämme zeigen lediglich die Tendenz, beim Gelatinestrich die Verflüssigung langsamer herbeizuführen, wobei das Bild des umgekehrten Tannenbaums entsteht. Dieses Phänomen ist aber nicht spezifisch für Milzbrand.

In Bezug auf den Tierversuch ist man sich im allgemeinen darüber einig, daß einige wenige Anthraxstämme nicht mäusepathogen sein können, dagegen aber auch einige anthraxähnliche Keime eine Pathogenität für Mäuse zeigen. Bei Seidel's Versuchen waren von 101 Anthraxstämmen alle für Mäuse pathogen, aber nur 39 davon für Meerschweinchen. Ein hoher Prozentsatz, nämlich 42 % von Stämmen des *Bac. cereus*, war für Mäuse, ca. 12 % für Meerschweinchen, aber kein Stamm für Kaninchen pathogen. Weidenmüller (1952) schildert einen tödlich verlaufene Infektion mit einem Pseudostamm beim Menschen. Nach Nordberg führten von 42 Stämmen des *Bac. mycoides* bei Prüfung im Mäuseversuch 21 zum Tode innerhalb 20-96 Stunden. Die Thermoprobe nach Ascoli kann wie schon erwähnt, bei Vorliegen echten Milzbrandes versagen. Bei den Untersuchungen von Weidenmüller (1952) waren von 12 Anthraxstämmen alle ascolipositiv und von 28 milzbrandähnlichen aeroben Sporenbildnern 11 ascolipositiv, 3 zweifel-

haft und 14 negativ. Pfeiler und Drescher kamen bei Arbeiten mit Kulturauszügen von milzbrandähnlichen Stämmen sogar zu dem Ergebnis, daß diese präzipitierende Milzbrandsera stärker als Anthrax beeinflussen können.

Während Weidenmüller (1954) den Perlschnurtest für optimal spezifisch hält, stellten Brown und Mitarbeiter fest, daß ein für Kaninchen vollvirulenter Stamm aus einer Epidemie in Ohio auf dem Penicillinagar keine Wachstumshemmung erfuhr. 50 Labor- und Sammlungsstämmen zeigten bei Weidenmüller die für Anthrax charakteristischen Perlenketten und 43 anthraxähnliche Sporenbildner zeigten entweder normales Wachstum auf allen 3 Plättchen oder Wachstumshemmung bei der höheren oder bei beiden Penicillinkonzentrationen ohne oder mit Formveränderungen, die von denen des Milzbrandes völlig verschieden waren. Seidel's Untersuchungen führten bezüglich des Perlschnurtestes zu ganz brauchbaren Ergebnissen. Es befanden sich aber auch irreguläre Reaktionen darunter.

Der von Mc. Cloy isolierte Phage besitzt neben einer großen Hemmungsaktivität für Milzbrandkeime auch eine ganz geringe für *Bac. cereus* - 2 der geprüften *Cereus*-Stämme wurden von ihm angegriffen.

Brown und Cherry, die dem von ihnen entdeckten Gammaphagen eine hohe Spezifität zuschrieben, mußten erfahren, daß ihr Phage 4 pathogene nicht-rhizoide *Mycoides*-Stämme lysierte.

Der Vollständigkeit halber seien noch von *Bac. anthracis* das Fehlen von Lecithinase, das aber auch einige milzbrandähnliche Keime auszeichnet, angeführt. Das geringe Reduktionsvermögen von Anthrax - im Vergleich zu *Cereus*stämmen wird auch als Möglichkeit zur Differenzierung angegeben (Seidel). Die Ausführungen zeigen, daß die Auswertung keiner der angeführten Eigenschaften des *Bac. anthracis* als sicheres Kriterium zur zweifelsfreien Diagnostik berechtigt. Es müssen deshalb mehrere Verfahren bei der Untersuchung eines verdächtigen

Keimes angewandt werden, um eine sichere Diagnose stellen zu können. So sind auch durch den Gesetzgeber in der Anlage 1 zur Abänderung der Ausführungsvorschriften zum Preuß. Ausf. Gesetz zum Viehseuchengesetz (Rd. Erl. d.M.d.I. vom 1.1.1933 - III b 7719/32) und in der Anlage I der Ausführungsbest. A des Fleischbeschaugesetzes von 1940 für den Laboratoriumstierarzt zwingend die Verfahren der Milzbranddiagnostik vorgeschrieben.

Auszuführen sind dort die bakteriologische Untersuchung und die Schichtprobe nach Ascoli sowie erforderlichenfalls die Züchtung auf Agarplatten und der Mäuseimpfversuch.

Tabelle 1

Eigenschaften des Bacillus anthracis, die mit denen verschiedener mildbrandähnlicher Keime zum Teil übereinstimmen.

	Bac.anthr.	Bac.mes.	Bac.subt.	Bac.myc.	Bac.negath.	Bac.cereus
Morphol.i. Grampräp.	grampos.plump quer abgeschn.	Dasselbe	aber	Enden	zumeist	rund
Kapselbildung	+ 1)	-	-	-	-	-
Beweglichkeit	- 2)	+	+	+	+	+
Kolonie auf Agar	matt, lok- kenartige Ausläufer	dünn, durch- schein.Neig. z.Ausbreitg.	matt, trock. Ausläufer	matt,wur- zelart. Ausläufer	groß, glzd., cremeweiß bis gelb	groß, flach scharf be- grenzt, z.T.gelb
Hämolyisin	- 3)	- 4)	- 4)	+	+	+
Bouillon Säule Boden	meist klar Flocke	trüb	trüb	klar Bodensatz	trüb	trüb
Mäusepatho- genität	+	-	-	- (+)	-	- (+)
Pathog.f.größ. Säuger bei künstl.Inf.	+	-	-	-	-	- (+)
Thermoprä- zipitation	+	- (+)	- (+)	- (+)	- (+)	- (+)
Perlschnurtest	+ 5)	-	-	-	-	-
Phagentest	+	-	-	- (+)	-	- (+)

- 1) Bei Kulturbazillen und bei Equiden-Organmaterial zumeist fehlende Kapselbildung (-).
- 2) Die von Brown und Cherry erzeugten Mutanten waren bei Züchtung aus Versuchstieren wieder beweglich.
- 3) Viele in ihrer Virulenz nicht zu stark geschwächte Keime zeigen Hämopepsie.
- 4) Bringen meist Hämopepsie hervor.
- 5) Nur der von Brown erwähnte Ohio-Stamm verhielt sich bei diesem Test atypisch.

Zusammenfassung der Literatur zur Bakteriologie des Milzbranderreger.

Zur Feststellung der Milzbrandkeime werden in der Literatur 6 Wege angegeben:

1. Der mikroskopische Nachweis, wobei man sich bei Organmaterial (Blut, Milz) von Tieren - außer Material vom Pferde - die Kapselbildung zunutze macht.
2. Der kulturelle Nachweis.
3. Der Nachweis mit Hilfe des Tierversuchs.
4. Der Nachweis mit der Präzipitationsprobe nach Ascoli.
5. Der Perlschnurtest als Nachweismethode.
6. Der Nachweis mit Hilfe des Phagentestes.

Beim mikroskopischen Nachweis hat sich die Foth'sche Färbung gut bewährt. Haupt hat färberisch in einigen an einen Besenstiel angetrockneten Blutstropfen - die einzigen Reste eines unerkannt an Milzbrand verendeten Rindes - Milzbrandschatten (leere Kapseln) nachgewiesen.

Zum kulturellen Nachweis eignet sich nach erfolgter Reinkultivierung die Züchtung auf Blutplatten, in Bouillon und auf 0,5 %igem Agarnährboden in feuchter Kammer, wobei auf letzterem die Beweglichkeit des verdächtigen Keimes geprüft wird.

Der Tierversuch nimmt einen nicht unbedeutenden Platz in der Milzbranddiagnostik ein.

Die Thermopräzipitation nach Ascoli ist funktionsfähig, wenn genügend freies Präzipitinogen in den Organen vorhanden ist, und auch wertvoll, wenn mikroskopisch oder kulturell keine Keime mehr nachzuweisen sind.

Der Perlschnurtest ist eine recht brauchbare Methode, die aber den Nachteil hat, daß die penicillinhaltigen Nährböden nicht lange aufbewahrt werden können und deshalb für jede Untersuchung neu hergestellt werden müssen.

Mit Hilfe des Phagentestes kann bei Vorliegen von Reinkulturen die Diagnose schnell und sicher, sogar von Ungeübten durchgeführt werden.

Die Kombination mehrerer Methoden ermöglicht eine sichere Diagnose des *Bacillus anthracis*.

Eigene Untersuchungen

Es war mir die Aufgabe gestellt, importierte Wolle, Wollabfälle und Schlammproben auf das Auftreten von Milzbrandkeimen zu untersuchen. Auch sollten Versuche über die Brauchbarkeit eines Selektivnährbodens für Milzbrandbazillen, der bislang nur in der amerikanischen Literatur Erwähnung fand, angestellt werden. Ferner hatte ich mich im Rahmen dieser Arbeit mit neueren Differenzierungsmöglichkeiten des *Bacillus anthracis* zu befassen.

I Untersuchungsmaterial

Für meine Untersuchungen verwendete ich 100 Ziegenhaar-, Kamelhaar- und Schafwollproben. Die Herkunftsländer waren Nord- und Südafrika, Italien, China, Mongolei, Pakistan und Irak.

Die teilweise vom Hamburger Hafen mit der Bahn, zum Teil mit Lastwagen in den Verarbeitungsbetrieb beförderten, in der Regel mit Jute umhüllten Wollballen werden in den Lagerschuppen nach Herkunftsland und Wollsorte getrennt gestapelt. Ein kleiner Teil des Materials ist bereits im Ausfuhrland gewaschen worden; beim Rest handelte es sich um Rohware. Die Probenentnahme erfolgte zumeist aus Ballen, deren Juteumhüllungen schadhaft waren, und zwar zum Teil vom Rande, zum Teil aus der Mitte der Ballen. Sterile Kautelen wurden bei der Entnahme nicht beachtet, wohl aber die einzelnen Proben in undurchlässige Tüten gefüllt und diese sorgfältig mit Papier umhüllt. Eine Übertragung der Sporen auf die Hände und von diesen auf spätere Proben ist also bei der Entnahme nicht sicher ausgeschlossen.

Einem Haufen Wollabfall, der im Freien lagerte und als Dünger vorgesehen war, entnahm ich 15 Proben. Der

Abfall entsteht an verschiedenen, in den Verarbeitungsprozeß eingeschalteten Maschinen, wird vom Entstehungsort aus in einen Sammelturm geblasen und wurde bei der Leerung des Turmes einige Zeit lang an die Bauern der Umgebung kostenlos als Dünger abgegeben. Der Abfall besteht aus kurzen, gefärbten und ungefärbten Wollhaaren, Futterresten, Kotteilchen und Staub.

Aus der Tiefe einer Abwassergrube, von der das überlaufende Wasser in die Kanalisation und von dort in die Sammelkläranlage fließt, wurden insgesamt 17 Schlamm- und Abwasserproben entnommen und untersucht.

II Untersuchungstechnik

A der Wollproben

Die Untersuchungstechnik ist im Laufe der Untersuchungen auf Grund der gewonnenen Erfahrung abgeändert worden. Bei den ersten Versuchen wurde die Waschbrühe in folgender Weise gewonnen:

Ca. 40 g Wolle werden mit einem Liter physiologischer Kochsalzlösung und 1 g Pril in einem 2,5 l fassenden Kolben ca. 10 Minuten lang gründlich durchgeschüttelt.

Die Verimpfung dieser Waschbrühe auf Nähragarplatten wird nach folgender Vorschrift ausgeführt:

Anschließend werden von dieser Waschbrühe ca. 350 ccm in einen Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen von 500 ccm gefüllt und 1/2 Stunde lang auf 75° C erhitzt. Nach Abkühlung werden hierzu ca. 20 ccm Petroläther hinzugefügt und das ganze kräftig geschüttelt. Wenn nach etwa 1/2-stündigem Stehen sich eine dünne Petrolätherschicht über der Waschflüssigkeit angesammelt hat, wird von ersterer mit einem "Ölstab" Material entnommen und auf 2 Agarplatten ausgestrichen, die zur Abdunstung des Äthers, der das Auskeimen der Sporen hemmen kann, 1/2 Stunde halb geöffnet bleiben und dann

bei 37° C in der üblichen Weise bebrütet werden. Die Ablesung erfolgt nach 1,2 und 3 Tagen Brutschrankaufenthalt.

Die Herstellung der "Ölstäbe" geschieht, indem über das Ende eines dünnen Glasstabes ein Bausch aus Zellstoff gestülpt und mit Filtrierpapier überzogen wird. Der Filtrierpapierüberzug wird mit Blumen draht am Glasstab befestigt. Eine Stunde vor Gebrauch werden die Kuppen der Tupfer in steriles Olivenöl getaucht.

In den weiteren Versuchen wurde zunächst auf das zeitraubende Erhitzen verzichtet und an Stelle der physiologischen Kochsalzlösung Leitungswasser, jedoch ebenfalls mit Prilzusatz benützt.

Um auch die von Äther nicht abgetöteten saprophytischen Nichtsporenbildner zu vernichten, verwendete ich später zur Abtötung statt Äther Trichloräthylen.

Ca. 40 g Wolle werden mit einem Liter Leitungswasser und 1 g Pril in einem Kolben gründlich geschüttelt.

Ca. 300 ccm Waschbrühe werden 25-30 ccm Trichloräthylen und nach kräftigem Durchschütteln 20 ccm Äther zugefügt. Die Beimpfung der Platten erfolgt wie auf Seite 30 angegeben.

B der Haarabfallproben

Bei den Haarabfallproben wurden von jeder Probe ca. 60 g verarbeitet und dabei in der oben angegebenen Weise verfahren.

C der Schlammproben

Die Untersuchung der Schlamm- und Abwasserproben erfolgte ohne Zusatz von Wasser und Pril. Bei diesen Proben war die keimtötende Wirkung des Äthers unzureichend und wurde mit Trichloräthylen erzielt.

Von einem Teil der Proben (15 Abfall- und 16 Schlammproben) wurden neben gewöhnlichen Agarnährböden auch je zwei Spezialnährböden mit Lysozym- und Hämatinzusatz nach Pearce und Powell beimpft.

Zur Kontrolle wurde eine Reihe von Nebenversuchen notwendig:

Durch den Prilzusatz fiel der p_H -Wert auf 6. Ein weiterer Versuch diente der Prüfung einer ungünstigen Einwirkung eines niederen p_H auf Milzbrandsporen, wie er durch Prilzusatz zum Waschwasser auftrat.

Es wurde Waschwasser durch Zusatz von Salzsäure auf p_H 5 eingestellt und Milzbrandsporen mit diesem vermengt. Im Kulturversuch war die Anzahl der Keime nach 24-stündiger Einwirkung nicht verringert.

In ca. 5 %igem Äthergemisch wurden Colibakterien nach kurzer Zeit (1 Minute) abgetötet.

In 5-10 %igem Äthergemisch wurden Staph. pyog. aur. nach 6 Stunden nicht abgetötet.

Nach Hornig tötet Trichloräthylen alle vegetativen Keime in spätestens 5 Minuten ab; nicht jedoch Milzbrandsporen.

Besprechung der Untersuchungstechnik:

Die wohl geläufigste Methode zur Untersuchung milzbrandverdächtigen Materials ist die Präzipitationsprobe nach Ascoli. Sie wurde ursprünglich entwickelt für die serologische Austestung von Organextrakten, in welchen das Präzipitinogen vieler zerfallener Bazillen vorliegt. Die bereits aufgewiesenen Grenzen der Ascoliprobe (siehe Seite 16 und 23/24) zeigen deutlich, daß diese Reaktion bei unserem mit zahlreichen Saprophyten und wahrscheinlich mit wenigen Milzbrandkeimen behaftetem Material kaum in Frage kommen dürfte. Es ist ferner im Hinblick auf die gestellte Aufgabe zu bedenken, daß auch eine positive Ascoli-Reaktion nichts über das Vorliegen intakter infektionstüchtiger Milzbranderreger, die allein eine dauernde Infektionsgefahr darstellen, aussagt. Es darf weiterhin auf die geringe Beweiskraft negativer Ascoli-Reaktionen und den hohen Preis des präzipitierenden Serums hingewiesen werden.

Gegen die Durchführung des Tierversuches kann eingewendet werden, daß der Gehalt des Waschwassers an Milzbrandkeimen zu gering sein kann, um zur Erkrankung bzw. zum Tod der Versuchstiere zu führen. Martos ist es gelungen, mit einem einzigen Keim einer hochvirulenten Kultur, den er mit Hilfe eines besonderen Verfahrens isolierte, bei 28 % der Mäuse eine tödliche Infektion zu setzen. Mit 20 Keimen gelang ihm dies bei jeder Maus. Kolle-Hetsch hält den Nachweis von Milzbrandkeimen im Tierversuch in stark mit Saprophyten durchsetztem Material - um solches Material handelt es sich in unserem Fall - für außerordentlich schwierig oder überhaupt unmöglich, weil bei den Versuchstieren andere in diesem Material vorhandene pathogene Bakterien namentlich Anaerobier sich rasch vermehren und frühzeitig zum Tode führen.

Auch der mikroskopische Nachweis (Kapselfärbung) von Milzbrandkeimen dürfte wegen der starken saprophytären Verunreinigung des Materials nicht zum Ziele führen. Zudem fand sich nirgends ein Hinweis auf einen erfolgsversprechenden Einsatz dieser Methode, wie z.B. an die Wolle angetrocknetes Blut.

Perlschnur- und Phagentest können nur zur Diagnose herangezogen werden, wenn verdächtige Keime in Reinkultur vorliegen. So wurde bei dem vorliegenden Material die kulturelle Methode des Nachweises von Milzbrandbazillen gewählt und diese nach der Technik von Hailer und Heicken (1950) orientiert.

Diese beiden Autoren haben sich folgender Technik zum kulturellen Nachweis von Milzbrandkeimen bedient:

Die Wolle wurde im Mörser mit Wasser angefeuchtet, fein zerschnitten, mit Pistill und Seesand kurze Zeit gerieben und nach Zugabe von etwa 8 ccm Wasser in sterile Reagenzröhrchen eingefüllt. Nach Erhitzung auf 65° C für eine halbe Stunde erfolgte die weitere Verarbeitung mit Direktausstrich und Conradischer Ölstabmethode, welche folgendermaßen ausgeführt wurde: Der Rest des Breies wurde mit der darüber stehenden Flüssigkeit in 25 ccm fassende Pulverfläschchen mit eingeschliffenem Glasstopfen gegossen und mit 0,5 ccm Petroläther überschichtet. Nach Zugabe des Petroläthers, sowie nach halbstündigem Stehen, wurde die Flasche kräftig geschüttelt. Nach einer weiteren halben Stunde wurde der auf der wässrigen Phase in einer scharf markierten Schicht abgeschiedene Petroläther mit einem Ölstab aufgenommen, der anschließend auf zwei Agarplatten ausgestrichen wurde. Um den aufgebrauchten Äther, der auf Sporen stark entwicklungshemmend wirkt, zum Verdunsten zu bringen, wurden die Platten bei Zimmertemperatur mit halbgeöffneter Oberschale etwa 30 Minuten lang gelüftet und dann bei 37° C bebrütet. Die Herstellung der Ölstäbe geschah in folgender Weise: Über das Ende eines etwa bleistiftstarken Glasstabes wurde ein Bausch aus nicht entfetteter Watte gestülpt und mit Filtrierpapier überzogen. Der Filtrierpapierüberzug wurde mit Blumendraht am Glasstabe befestigt. Sterilisation der fertigen Ölstäbe erfolgte mit Heißluft von 180° C. Am Vortage des Versuches wurden die Kuppen der Tupfer in steriles Olivenöl getaucht und bis zum Gebrauch in sterilen Gefäßen aufbewahrt.

Die Conradische Ölstabmethode geht auf eine Angabe von Lange und Nitsche zurück, die gefunden hatten, dass

Diphtheriebakterien sich aus einer Aufschwemmung in Kochsalzlösung durch Ligroin ausschütteln lassen. Daraus entwickelte Conradi die oben angegebene Methode, bei der er statt Petroläther Pentan verwendete und damit Diphtheriebakterien anreichern konnte.

Auch bei Milzbrandsporen kann mit dieser Methode eine Anreicherung erzielt werden, da die Anthraxsporen bei ihrem etwas geringeren spezifischen Gewicht mit dem Äther an die Oberfläche steigen.

Hailer und Heicken (1953), die sich eingehend mit dem Milzbrandnachweis an Häuten befaßten und dabei den Ausstrich des Materials vornahmen, stellten fest, daß der Nachweis bei letzterer Methode mit größerer Wahrscheinlichkeit als mit dem direkten Kulturverfahren gelingt. Von 917 positiven Befunden wurden 425 gleichzeitig mit beiden Verfahren gewonnen. Bei 218 war es nur mit dem direkten Verfahren und bei 272 Proben mit der Ölstabmethode möglich, Milzbrandkeime zu ermitteln.

Bei der Bereitung des Waschwassers von Woll- und Wollabfallproben wurden dem Wasser geringe Mengen (ca. 1 g) Pril zugegeben. Dies geschah, um die Oberflächenspannung des Wassers herabzusetzen und damit eine bessere Abschwemmung des Schmutzes und der Sporen von den Haaren zu erzielen.

Johnes ist auf Grund seiner Untersuchungen zu der Feststellung gelangt, daß Milzbrandsporen nicht so hitzeresistent sind wie allgemein angenommen wird. Er fand, daß Sporen bei 80° C eine halbe Stunde erhitzt zum Teil zugrunde gehen, jedoch eine Temperatur von 65° C schadlos vertragen. Diese Temperatur tötet aber nicht alle Bakterien und die vegetativen Formen der Sporenbildner ab. Ich habe daher nach einigen diese Auffassung Johnes' bestätigenden Versuchen und auch aus Gründen der Zeitersparnis von einem Erhitzen des Waschwassers völlig abgesehen. Der von Pearce und Powell in die Milzbranddiagnostik eingeführte Nährboden wurde in unsere Untersuchungen mit einbezogen, um seine Leistungsfähigkeit bei der Hemmung milzbrandähnlicher Keime und der Isolierung von Milzbrandkeimen nachzuprüfen.

Das Lysozym und Hämatin enthaltende Nährmedium ermöglicht nach Angaben der genannten Autoren das Wachstum von Milzbrandkeimen und hemmt gleichzeitig 95% der im Boden vorkommenden Bakterien.

Herstellung: Der Nährboden besteht aus einer Volumeneinheit 400 Gamma Hämin pro Kubikzentimeter enthaltender 0,01 n-Natronlauge und einer Volumeneinheit 600 Gamma Lysozym pro Kubikzentimeter enthaltender 0,01 n-Essigsäure, die zu 8 Volumeneinheiten Peptonagar, (Pept. 2%, Na Cl 0,5%, Agar 2%, pH 7,4%) gegeben werden. Der Agar muß vor Hämatin- und Lysozymzusatz verflüssigt und auf 60° C abgekühlt werden. Die Platten werden sofort ausgegossen, da ein nochmaliges Erhitzen viel Lysozym zerstört.

Die beimpften Platten werden bei 37,5° C oder 40° C 16 - 20 Stunden lang bebrütet. Die Auslesefähigkeit des Nährbodens soll bei der höheren Temperatur besser sein; die zumeist eintretende totale Hemmung von *Bac. mycoides* wird als wesentlicher Vorteil erachtet, doch gehen bei dieser Kulturmethode 20 % der im Ausgangsmaterial vorhandenen Milzbrandkeime zugrunde, bzw. keimen nicht aus. Bei beiden Bebrütungstemperaturen ist die Wachstumsrate von Anthrax jedoch nicht wesentlich verschieden. Auf dem Pearce- und Powell-Nährboden ist das Auswachsen vegetativer Formen um 1 1/2 Stunden verzögert und die Kolonien erreichen nur die Hälfte oder zwei Drittel der auf gewöhnlichem Agar üblichen Größe, haben eine glänzende Oberfläche, sind etwas konvex und besitzen nur kurze Ausläufer.

Die Abtötung der Begleitbakterien erfolgte bei dem Waschwasser von 30 Wollproben durch Erhitzen, bei 54 Waschwässern nur durch Äther, und bei 16 durch Trichloräthylen.

Auf keiner der mit derart vorbehandeltem Material und mittels Ölstab beimpften Platten erfolgte ein so starkes Überwuchern des Nährbodens, daß ein Auffinden verdächtiger Kolonien unmöglich wurde. Bei stark

verschmutzten Wollproben war die keimtötende Wirkung des Äthers nicht wirksam genug, sodaß zu Trichloräthylen gegriffen wurde. Das Aufsuchen milzbrandverdächtiger Kolonien erfolgte auf Grund ihres Aussehens und der von Hailer-Heicken (1953) berichteten Tatsache des Fadenziehens, welches beim Abimpfen mit der Öse zustande kommt.

III Untersuchungsergebnisse

Auf den beimpften Platten, die nach 20 Stunden, 2 und 3 Tagen durchgesehen wurden, konnte eine größere Zahl milzbrandverdächtiger Kolonien festgestellt werden, von denen nach einer orientierenden Beweglichkeitsprüfung 52 Reinkulturen gezüchtet wurden. Auf manchen Platten waren 2 - 4 verdächtige Kolonien zu finden. Es ergaben 100 Wollproben 41, 15 Abfallproben 8 und 16 Schlamm- und Abwasserproben 3 verdächtige Reinkulturen. Insgesamt wurden also 52 verdächtige Kolonien gewonnen.

Die vergleichsweise mit demselben Material beimpften Selektivnährbodenplatten (Pearce und Powell) zeigten nur 1/15 bis 1/20 der auf gewöhnlichen Agarplatten gewachsenen Kolonien. Die mit einem bekannten Milzbrandstamm beimpften Platten ließen kleinere Kolonien mit glänzender Oberfläche und feinen kurzen Ausläufern mit geringer Tendenz zum Zurücklaufen entstehen. Aus den Kulturen auf Selektivnährböden wurden 8 und aus denen auf gewöhnlichen Agarplatten derselben Proben 11 milzbrandverdächtige Stämme gezüchtet, sodaß möglicherweise bei Anwendung des Spezialnährbodens mit gewissem Verlust zu rechnen ist. Bei Material, das wie Schlamm- und Bodenproben stark durch sporenbildende Saprophyten durchsetzt ist, ist der Selektivnährboden wesentlich von Vorteil. Enthält das Material jedoch wenige Bac. anthrac., so kann die Verwendung des P. u. P.-Nährbodens ein negatives Ergebnis vortäuschen.

Die Differenzierung der gezüchteten anthraxverdächtigen Reinkulturen erfolgt durch ihre Prüfung auf Beweglichkeit, ihr Verhalten auf der Blutplatte, in Bouillon, im Tierversuch und im Perlschnurtest.

Die Beweglichkeitsprüfung wurde bereits vor Anlegen von Reinkulturen mit den verdächtigen Kolonien zur Orientierung durchgeführt. Auf den Objektträger wurde ein Tropfen physiologischer Kochsalzlösung gebracht und darin etwas Bazillenmaterial verrieben, ein Menschenhaar daraufgelegt, mit einem Deckgläschen bedeckt und unter dem Mikroskop betrachtet (Haupt). Die Blutplatten und Bouillonröhrchen wurden nach 20-stündiger Bebrütung abgelesen.

Ein Teil der bei den Versuchen verwendeten Mäuse wurde mit 0,5 ccm Bazillenaufschwemmung subkutan geimpft, der andere Teil mit einer Öse Bazillen subkutan an der Schwanzwurzel. Zur Kontrolle der Todesursache wurden von den Tieren Blut- und Milzausstriche nach Foth gefärbt und mit Material aus der Milz Blutagarplatten angelegt. Auch die Ascoli'sche Probe wurde bei einem Teil der gestorbenen Mäuse (von Stamm 27 - 41) herangezogen und mit Leber- und Milzmaterial ausgeführt.

Dem Phagentest wurden alle Stämme nach der auf Seite 20/21 angegebenen Technik unterzogen; Nr. 1 - 36 hat Kielwein bei seiner Arbeit getestet und den Rest konnte ich prüfen.

Die Ergebnisse dieser Prüfung sind in Tabelle 2 niedergelegt.

Tabelle 2

Differenzierung milzbrandverdächtiger Reinkulturen

Nr. der verd.Kult. a. Wollpr.	Beweglichkeit	Blutplatte +=Hämolyse	Bouillon, 24 st. +=Trübung -=Bodensatz	Tierversuch Maus	Perlschnurtest
1	schw.bewegl.	+	+	n.21 Tg.leb.	kurze Stäbchen
2 M	unbeweglich	-	-	n. 1 Tg.tot	Perlschnüre
3 M	unbeweglich	-	-	n. 2 Tg.tot	"
4 M	unbeweglich	-	-	n. 1 Tg.tot	"
5 M	unbeweglich	-	-	n. 2 Tg.tot	"
6	schw.bewegl.	schwach +	+	n.21 Tg.leb.	lange Stäbe und Ketten
7 M	unbeweglich	-	schwach +	n. 1 Tg.tot	Perlschnüre
8 M	unbeweglich	-	-	n. 1 Tg.tot	"
9 M	unbeweglich	-	-	n.16 St.tot	"
10 M	unbeweglich	-	schwach +	n. 1 Tg.tot	"
11 M	unbeweglich	-	-	n. 1 Tg.tot	"
12 M	unbeweglich	-	-	n. 1 Tg.tot	"
13 M	unbeweglich	-	-	n. 2 Tg.tot	"
14 bis 20 M	unbeweglich	-	-	n.1-2 " tot	"
21	fragl.bewegl.	+	+	n. 2 Tg.tot	kurze parallele Stäbe
22 M	unbeweglich	-	-	n. 1 Tg.tot	Perlschnüre
23	mäßig bewegl.	+	+	n. 3 Tg.tot	schlanke Stäb- chen kurze Kett.
24	unbeweglich	+	+	n.21 Tg.leb.	dito
25	schw.bewegl.	+	+	n.21 Tg.leb.	"

Nr. der verd.Kult. a. Wollpr.	Beweglichkeit	Blutplatte +=Hämolyse	Bouillon, 24 st. +=Trübung -=Bodensatz	Tierversuch Maus	Perlschnurtest
26	unbeweglich	+	+	n. 21 Tg. leb.	lange Fäden
26a M (Kontr.)	unbeweglich	-	-	n. 21 Tg. leb.	Perlschnüre
27	unbeweglich	-	-	n. 21 Tg. leb.	kurze Fäden
28	schwer bewegl.	+	+	n. 5 Tg. tot	längere Ketten
29	unbeweglich	+	-	n. 21 Tg. leb.	Lange u. kurz. Fäden
30 M	unbeweglich	-	schwach +	n. 17 St. tot	Perlschnüre
31 M	unbeweglich	-	-	n. 2 Tg. tot	"
32 M	unbeweglich	-	schwach +	n. 20 St. tot	"
33 M	unbeweglich	-	-	n. 16 St. tot	"
34 M	unbeweglich	-	-	n. 18 St. tot	"
35 M	unbeweglich	-	schwach +	n. 30 St. tot	"
36	schw. bewegl.	-	-	n. 17 St. tot	kurze Stäbchen
37 M	unbeweglich	-	-	n. 24 St. tot	Perlschnüre
38	beweglich	-	+	n. 4 Tg. tot	kurze Fäden
39 M	unbeweglich	-	+	n. 2 Tg. tot	Perlschnüre
40	unbeweglich	+	+	n. 21 Tg. leb.	Parall. lieg. Stäbchen
41 M	unbeweglich	-	-	n. 3 Tg. tot	Perlschnüre
aus Abfall:					
42 M	unbeweglich	-	schwach +	n. 1 Tg. tot	"
43	beweglich	-	-	n. 3 Tg. tot	lange Stäbchen
44 M	unbeweglich	-	-	n. 2 Tg. tot	Perlschnüre
45 M	unbeweglich	-	-	n. 1 Tg. tot	"
46 M	unbeweglich	-	schwach +	n. 30 St. tot	"
47	schw. bewegl.	+	+	n. 21 Tg. leb.	lange u. kurz. Ketten
48 M	unbeweglich	-	-	n. 2 Tg. tot	Perlschnüre
49 M	unbeweglich	-	-	n. 1 Tg. tot	"
a/Schlamm:					
50	schw. bewegl.	-	+	n. 21 Tg. leb.	kurze Fäden
51	unbeweglich	+	+	n. 5 Tg. tot	lange Stäbchen
52 M	unbeweglich	-	-	n. 2 Tg. tot	Perlschnüre

Die Diagnose Milzbrand wurde gestellt (vergleiche Kennzeichnung M hinter der Stammnummer), wenn die Keime unbeweglich waren, die Blutplatte nicht hämolysierten, keine starke Trübung der Bouillon erzeugten, weiße Mäuse zu töten vermochten und sich auf Penicillin-nährböden im Perlschnurtest typisch verhielten. Dieses Ergebnis wurde überdies durch den Phagentest bestätigt. In einigen Fällen wurden durch die Ascoli-Präzipitation die Ergebnisse nachgeprüft. Diese Prüfung war, bei dem Milzbrandstamm 32 angestellt mit Mäusmaterial und bei Stamm 39 angestellt mit Kulturmateriel, negativ. Die mit dem Stamm 21, 23, 28, 36 und 38 geimpften Mäuse starben, ohne jedoch bei der Sektion Milzbrandbazillen erkennen zu lassen. Die mit dem Stamm 43 geimpfte Maus starb und ließ Milzbrandbazillen im Blut erkennen, obwohl die bakteriologische Untersuchung des Stammes die Nichtzugehörigkeit zu Milzbrand zeigt. Da mehrere Mäuse in einem Glas gehalten wurden, beziehe ich diese Milzbrandinfektion auf eine Ansteckung von einem anderen Tier.

Von den 52 untersuchten milzbrandverdächtigen Kulturen wurden 35 als zu *Bacillus anthracis* gehörig differenziert.

Bezogen auf das Ausgangsmateriel bedeutet dies, daß von 100 Woll- und Haarproben 23 mit Milzbrand durchsetzt waren, sowie daß von 15 Haarabfallproben 6 und von 16 Schlamm- und Abwasserproben 1 Milzbrand erhielten. Von insgesamt 131 untersuchten Proben wurden in 30 Fällen Milzbrandkeime ermittelt.

Milzbrandsporengehalt verschiedener Wollsorten
und ihr Herkunftsland:

Anzahl der unters. Proben	Art des Materials	Herkunfts- land	Zahl der milzbrand- haltig.Pr.
x) 14	Grau Ziegenhaare	Südamerika	0
5	Weißes "	"	1
xx) 22	Schwarze "	China	15
5	Graue "	"	1
5	Bunte "	Irak	0
7	Graue "	"	3
8	" "	Mongolei	0
8	Gemischte "	Marokko	2
3	" "	Südafrika	0
5	Gerberwolle v.Schaf	Algerien	0
2	" v. "	Italien	0
8	Weißes Schafwolle	Pakistan	1
2	Gelbe "	"	0
6	Kamelhaare	Nordafrika	0
100			23

x) Die Probeentnahme erfolgte zweimal im Abstand von 4 Wochen von demselben Los, aber verschiedenen Ballen.

xx) Von diesem Material wurden, nachdem die 1. Untersuchung einen hohen Sporengehalt ergeben hatte, nochmals 12 Proben vom gleichen Los, aber aus verschiedenen anderen Ballen entnommen. Auch die zweite Serie dieser Ziegenhaare erwies sich als stark infiziert.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Mit dem kulturellen Verfahren, in das die Conradi'sche Ölstabmethode zur Keimanreicherung mit einbezogen wurde, gelang es, aus verschiedenen Materialien eines wolleverarbeitenden Betriebes Milzbrandsporen zu isolieren. Als Selektivnährboden zur Hemmung zahlreicher, vor allem im Schlamm anwesender aerober Sporenbildner, bewährte sich der Pearce- u. Powell-Nährboden. Seine Anwendung dürfte bei jenen Fällen in Frage kommen, in denen das Probenmaterial größere Mengen Anthraxsporen enthält, sodaß ein wohl immer auftretender Verlust durch Pearce- u. Powell-Nährboden in Kauf genommen werden kann. 23 % der Woll- und Haarproben waren mit Milzbrand-erregern infiziert. Sehr stark verseucht (59 %) waren chinesische Ziegenhaare. Auch mindestens 40 % der Proben von grauen Ziegenhaaren aus dem Irak beherbergten Milzbrandbazillen. Von den Haarabfallproben erwiesen sich 40 % und von den Schlammproben 6 % als mit Milzbrandsporen infiziert.

Mit Hilfe der durchgeführten Differenzierungsmethoden konnten Milzbrandkeime von milzbrandähnlichen in jedem Falle sicher abgetrennt werden.

Schlußbetrachtung:

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß in Rohwolle, Wollabfällen sowie im Abwasser und Abwasserschlamm des untersuchten Betriebes Milzbranderreger vorhanden sind. Aus dem diesbezüglichen Schrifttum ergibt sich, daß die Einfuhr solcher Rohmaterialien in allen Kulturländern die hauptsächlichste Quelle von Milzbrandkrankungen ist, wobei in erster Linie die mit diesem Material beschäftigten Personen und in zweiter Linie unsere Haustiere betroffen sind. Während veterinärpolizeiliche Vorschriften für Gerbereien und deren Abwässer bestehen, wodurch eine Verschleppung von Sporen vermieden werden soll, unterliegt bisher die Verwendung solcher Abfälle und Abwässer aus dem fraglichen Betriebe keiner veterinärpolizeilichen Beschränkung. Üblicherweise wurden die Abfälle sogar zur Düngung der Felder abgegeben. Der Inhaber des Betriebes ist von sich aus bereits vor einiger Zeit zu einer Desinfektion der angelieferten Materialien übergegangen. Die milzbrandverdächtige Wolle wird in einem Autoklaven hohen Temperaturen ausgesetzt. Dabei wirken Heißluft 10 Minuten, Dampf von 107° C bei 0,5 atü 40 Minuten und wieder Heißluft zum Trocknen 10 Minuten lang ein. Dieses vorbehandelte Material habe ich nicht untersucht und kann deshalb über die Sicherheit dieser Maßnahme nichts aussagen. Durch Zusammenarbeit der Veterinärverwaltung und der Gewerbepolizei kann die von solchen Betrieben ausgehende Gefahr abgestellt werden, wie dies die Erfahrungen in England gelehrt haben.

Auffällig ist bei meinen Untersuchungen, daß der Wollabfall mit Sporen stark, Schlamm- und Abwasser nur gering mit Milzbrandkeimen verunreinigt waren. Von einer stärkeren Verdünnung des Infektionsmaterials abgesehen, dürfte es vor allem der von Gundel angeführte Milzbrand-Coli-Antagonismus sein, der den geringen Sporengehalt erklären könnte. Die im Abwasser dieses Betriebes herrschende Temperatur von ungefähr 35° C führt wahrscheinlich zum Auskeimen der Milzbrandsporen, sodaß die empfindlicheren vegetativen Formen

zum Teil auch von den im Abwasser vorhandenen Chemikalien abgetötet werden dürften. Als Infektionsquelle tritt daher das Abwasser und der Schlamm gegenüber dem Rohmaterial und den Abfällen stark in den Hintergrund, da ja auch Gillissen nachweisen konnte, daß Anthraxkeime in Abwässern von Gerbereien nach 19 Tagen ihre Virulenz für weiße Mäuse verlieren und in der Bouillon atypisch wachsen.

Die Differenzierung der verdächtigen Kulturen wäre auch, wie die Ergebnisse zeigen, möglich gewesen, wenn wir uns z.B. nur des Phagentestes oder des Perlschnurtestes bedient hätten. Mit der Ausführung des Perlschnurtestes kann die Prüfung zweier weiterer Eigenschaften mühelos gekoppelt werden - das Verhalten in Bouillon und die Beweglichkeit. Das 3 Stunden bebrütete Bouillonröhrchen, aus dem das Material zur Beimpfung der 3 Plättchen stammt, wird noch weitere 17 Stunden bebrütet. Und statt eines gewöhnlichen Agarplättchens wird ein 0,5 %iges Nähragarplättchen nach Weidenmüllers Vorschlag (S. 13) auf den Objektträger gelegt und nach Ablesen des Perlschnurtestes noch weitere 3-5 Stunden in der feuchten Kammer bebrütet. Bei der Durchführung des Phagentestes auf der Blutplatte kann überdies das Verhalten des verdächtigen Keimes, bezüglich Kolonieform und Hämolyse auf demselben Nährboden nach weiterer 14-stündiger Bebrütung geprüft werden.

Literaturverzeichnis

- Archipov: Zit. nach Hutyra-Marek.
- Ascoli: Zit. nach H. Habs: Bakteriologischen Taschenbuch, 1954.
- Bergey: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1948.
- Brauell: Zit. nach Manninger.
- Brown, Moody und Cherry: Zit. nach Seidel.
- Bürger und Nehring: Veröff.Med.Verw., 19, 553, 1925.
- Buza: Zbl.Bakt., Abt.I, Orig., 146, 18, 1941.
- Cloy, Elinor: Studies on a lysogenic Bacillus strain. Journal of Hygiene, Vol.49, No.1, 1951.
- Conradi: Zit. nach Lange, L.
- Davaine und Rayer: C.R. Acad. Sci., 59, 429.
- Delafond: Zit. nach Manninger.
- Eidherr und Reichel: Archiv für Hygiene 105, 262, 1930.
- Eilert: Zit. nach Hutyra-Marek.
- Eurich: Proceedings of the Royal Soc. of Medicine 6, 1913.
- Fadyean, Mc.: J. comp. Path., 16, 35, 1903
- Francke und Müssemeier: Archiv für Tierheilkunde, 51, 530, 1924.
- Gegenbauer: Archiv für Hygiene, 89, 202, 1920.

- Gillissen: Zur Differenzierung von Milzbrand u. milzbrandähnlichen Sporenbildnern u. der Bedeutung ihres Vorkommens in Abwässern. Zbl. Bakt., Abt. I, Orig., 156, 99, 1950/51.
- Glenn, Van Ness und C.D. Stein: Soils of the United States Favourable for Anthrax. Journal of the American Veterinary Medical Association. Vol. 128, No. 1.
- Gonzenbach: Zit. nach Hutyra-Marek.
- Gundel: Zbl. Bakt., Abt. I, Orig., 104, 463, 1927.
- Hailer und Heicken: Mitteilung zur Frage der Milzbrandgefährlichkeit ausländischer Schaf- u. Ziegenfelle. Zeitschrift f.Hyg., 131, 443. (1950)
- Hailer und Heicken: Zeitschrift f.Hyg., 137, 611-639. (1953)
- Haupt: Vorlesung über Veterinärhygiene.
- Haupt: Demonstrationen von Seuchematerial.
- Heim: Arb. a. d. Kais. Ges. Amt, 18, 135, 1902.
- Hornig, K.: Prüfung der bakteriziden Eigenschaften des Trichloräthylens. Dissert., Gießen, 1955.
- Hutyra, Marek, Manninger u. Mocsy: Spezielle Pathologie u. Therapie der Haustiere, 10.Aufl., I.Bd., Verlag Fischer, Jena.
- Ivanovics: Immunitätsforschung, 93, 119, 1938.

- Januschke: Seuchenbekämpfung, 58 und 123, 1927.
- Jensen und Kleemeyer: Die bakterielle Differentialdiagnose der Anthraxbazillen mittels eines neuen Testes.
Zbl. Bakt., Abt. I, Orig., 159, 494.
- Johnes, E.R.: The Isolation of Bac. anthracis from Industrial Material with Special Reference to the Resistance of the Spores to Heat.
J. Path. and Bact. 54, 307, 1942.
- Kauker: Zit. nach Seidel.
- Kielwein: Ein Vorschlag zur praktischen Differenzierung d. Bac. anthr. durch den Phagentest.
Noch nicht veröffentlichte Arbeit aus dem T.L.U.A. Stuttgart.
- Koch, Gaffky und Löffler: Mitt. Reichsgesundheitsamt, 2, 147, 1884.
- Koch, R.: Cohn's Beitr. Biol. Pflanz., 2, 277.
- Kolle-Hetsch: Experimentelle Bakteriologie u. Infektionskrankheiten, 11. Aufl., 1952.
- Kraneveld und Manjoer: Zit. nach Hutyra-Marek.
- Kraus und Uhlenhuth: Handbuch der mikrobiologischen Technik, Bd. 2, Berlin u. Wien, 1923.
- Lange und Nitsche: Methoden zur Anreicherung.
Kraus-Uhlenhuth, 2, 855, 1923.
- Laubenheimer: Ztschr. f. Hygiene, 70, 321, 1912.
- Lütje: Beobachtungen über Milzbrandvorkommnisse im Stader Niederelbgebiet.
D.T.W., 44, 719, 1936.

- Martos: Zeitschr. f. Hygiene, 107, 477, 1927.
- Minett, F.C.: J. comp. Path., 60, 181, 1950.
- Minett and
Dhandra: Indian J. vet. Sci., 11, 308.
- Neufeld und
Ettinger: Zit. nach Hutyra-Marek.
- Nordberg, B.: Studies of B. anthr. in regard to its properties of diagnostic and pathogenetic importance. Zbl. Bakt., Abt. I, Ref., 150, 515, 1951.
- Olt, Johne
u. Foth: Zit. nach Roots.
- Pasteur: C. R. Acad. Sci., 92, 209.
- Pearce, T.W.
and Powell, E.O.: A Selective Medium for Bacillus anthracis. Journal of General Microbiology 5, 387, 1951.
- Pettenkofer: Zit. nach Hutyra-Marek.
- Pfeiler, W. und
Drescher, L.: Z. Inf. Krankh. u. Hyg. d. Haustiere, 13, 391, 1913.
- Pollender: Zit. nach Manninger.
- Rakette: Zit. nach Wagner: Leitfaden für den Kursus in der vet. Mikrobiologie, 2. Aufl., 1944.
- Rembold, Müsse-meier
und Beißwänger: Zit. nach Hutyra-Marek.
- Renaux, E.: Culture de Bac. anthr. en milieu calcique et en milieu oxalate. Zbl. Bakt., Abt. I, Ref., 156, 1955.
- Roots: Vorlesung über spezielle Mikrobiologie.

- Seidel, G.: Die aeroben Sporenbildner in der täglichen Praxis der bakter. Untersuchung d. von Tieren stammenden Lebensmittel.
Archiv f. Lebensmittelhyg. S. 178, 1955
- Schmidt, Gordon und Clark: Zit. von Bergey.
- Standfuß: Zur Laboratoriumsdiagnose des Milzbrandes.
T.U., 8, 163, 1953.
- Standfuß und Pohl: Archiv f. Tierheilkunde, 62, 178, 1930.
- Standfuß und Schnauder: Zbl. Bakt., Abt. I, Orig., 95, 61, 1925.
- Sterne, M.: Onderstepoort J. vet. Sci., 13, 313.
- Stokman: J. comp. Path., 24, 97, 1911.
- Tomcsik und Szongott: Immunitätsforschung, 76, 214, 1932.
- Wagner: Zbl. Bakt., Abt. I, Orig., 96, 419.
- Wanke, Sickert und Gaiger: Zit. nach Hutyra-Marek.
- Weidenmüller: Zur Laboratoriumsdiagnose des Milzbrandes.
(1952) T.U. 7, 409.
- Weidenmüller: Fortschritte in der Milzbranddiagnostik.
(1954) Monatshefte f. Tierheilkunde 6, 186.
- Wilson u. Miles: Topley und Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. 4. Aufl. London 1955. Vol. II, S. 1942.
- Winkle: Mikrobiologische und serologische Diagnostik,
Gustav Fischer, Jena, 1947.

Wirtz:

Zit. nach Roots:
Mikrobiologischer Kursus.

Wolf u. Heimann:

Amer. J. Hyg. 53, 80, 1951.

Zieger, W.:

Zbl. Bakt., Abt. I, Ref., 153,
2, 1954.

Lebenslauf

Am 28. August 1931 wurde ich, Albert R a u , als Sohn des Landwirts Albert Rau und seiner Ehefrau Katharina, geb. Schwarz, in Faurndau geboren.

Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich von 1942 bis 1951 die Hohenstaufen-Oberschule in Göppingen, wo ich im Juni 1951 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1952 begann ich in Giessen mein tierärztliches Studium und bestand auch dort am 17. März 1954 die Tierärztliche Vorprüfung. Die beiden ersten klinischen Semester konnte ich in Berlin an der Freien Universität im Rahmen des Studentenaustausches Berlin - Bundesrepublik studieren. Die restlichen 3 klinischen Semester absolvierte ich in Giessen und bestand am 21. Januar 1957 die Tierärztliche Prüfung.

Meine Praktikantenzeit leistete ich in der Zeit vom 15. April bis 15. Oktober 1957 bei Herrn Dr. K. Blind in Gaildorf/Württ. ab, wo ich z.Zt. als Assistent tätig bin.

